

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

YHANNDRA KARINE DIAS SILVA

**MAPEAMENTO CITOGÊNÉTICO DE *Passiflora alata* E *Passiflora watsoniana*
REVELA CONSERVAÇÃO DE SINTENIA NO SUBGÊNERO *Passiflora*
(Passifloraceae)**

**Recife
2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

YHANNDRA KARINE DIAS SILVA

MAPEAMENTO CITOGÊNÉTICO DE *Passiflora alata* E *Passiflora watsoniana*
REVELA CONSERVAÇÃO DE SINTENIA NO SUBGÊNERO *Passiflora*
(Passifloraceae)

Dissertação de mestrado apresentada por Yhanndra Karine Dias Silva ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal
Área de concentração: Sistemática e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Pedrosa-Harand (Depto. de Botânica, UFPE)

Recife
2018

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Silva, Yhanndra Karine Dias

Mapeamento citogenético de *Passiflora alata* e *Passiflora watsoniana* revela conservação de sintonia no subgênero *Passiflora* (Passifloraceae) / Yhanndra Karine Dias da Silva- 2018.

41 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Andrea Pedrosa-Harand
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Vegetal. Recife, 2018.

Inclui referências

1. *Passiflora* 2. Mapeamento citogenético 3. Retrotransposons I.
Pedrosa-Harand, Andrea (orient.) II. Título

583.626

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-049

YHANNDRA KARINE DIAS SILVA

**MAPEAMENTO CITOGENÉTICO COMPARATIVO DE *Passiflora alata* e
Passiflora watsoniana (Passifloraceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Área de Concentração Sistemática e Evolução, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em: 26/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Andrea Pedrosa Harand (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Ana Paula de Moraes (Examinadora Externa)
Universidade Federal do ABC

Profa. Dra. Ana Cristina Brasileiro-Vidal (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico aos meus amados pais, queridas
irmãs e aos meus avós, que são meus
anjos. Ao meu anjo que já se foi, Vó Téo.
In memorian.

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata a Deus por tudo que Ele tem sido, por todo sustento e força nesses últimos dois anos.

Um agradecimento especial a Andrea por todos os ensinamentos, paciência (que gastei muito a dela nesses dois anos), cuidado e por mostrar como se faz ciência com seriedade. Obrigada, pois é difícil achar quem não apenas orienta tão bem, mas por se dedicar com carinho a tudo. Nunca esquecerei. Poderia escrever muito aqui, mas faltariam palavras. Obrigada!

Muito obrigada, Gustavo! Você me arrastou para citogenética e sou muito grata por isso. Você sempre nos motiva a continuar melhorando, nos mostrando a importância de sermos autocríticos. Nunca vou esquecer tudo que você fez/faz por mim e por cada um que se dispõe a aprender. Professor Marcelo, sou grata por todos os ensinamentos, puxões de orelha, por todas as conversas, aulas incríveis e claro, pelo fornecimento de material vegetal! Muito obrigada!

Um agradecimento muitíssimo especial a Mariela. O que seria de mim nesse laboratório sem você? Eu aprendo tanto e torro toda sua paciência! Espero que você continue tendo muita, pois eu preciso aprender muito ainda.

Não poderia deixar de agradecer ao PPGBV e a cada funcionário que tanto nos ajudam com as burocracias, dúvidas e muitos problemas. Também agradeço a todos os funcionários responsáveis pela limpeza. Vocês são demais!

Aos meus queridos colegas de laboratórios, tanto os que ainda estão aqui, como os que alçaram outros voos: Amalinha, Mandinha, Brena, Mariela <3, Marianita, Paulinho, Ana, Gean, Dudinha, Espósito, Ribeirão, Karol, Lívia, André, Sandrinha, Helbert. São muitos e não quero esquecer de ninguém. Muita gratidão por cada ajuda, conversa, pelas alegrias e tristezas compartilhadas, pelos lanches e por todas as oportunidades de estarmos juntos. Obrigada a cada um. Foram super importantes nessa caminhada.

Não poderia deixar de agradecer ao mais ilustre e amado colega de laboratório, namorado, amigo, parceiro de todas as horas: Lucas. Obrigada por tudo, meu bem. Força para mais quatro anos aguentando e sustentando um ao outro diariamente. Por último, porém não menos importante, minha maior gratidão: minha família. Sem vocês eu não estaria aqui, literalmente. Meus pais, irmãs, avós...vocês me sustentaram com palavras, preces, amor. Obrigada!

RESUMO

Passiflora edulis Sims, *P. alata* Curtis e *P. watsoniana* Mast. pertencem ao gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*, sendo *P. alata* e *P. edulis* espécies filogeneticamente mais próximas entre si que *P. watsoniana*. Esse subgênero apresenta predominantemente $2n = 18$, entretanto, o gênero possui uma extensa diversificação cariotípica com espécies com $x = 6, 9, 10, 11$ ou 12 , sugerindo uma possível quebra de sintenia no subgênero com manutenção do número cromossômico. No presente trabalho, mapas citogenéticos comparativos foram construídos para *P. alata* e *P. watsoniana* usando hibridização *in situ* fluorescente com clones de BACs previamente mapeados em *P. edulis*, além do DNA ribossomal (DNAr) 35S e 5S e três retrotransposons (Ty1-copia, Ty3-gypsy e LINE). BACs selecionados de *P. edulis* foram mapeados em *P. alata* e *P. watsoniana*, e mostraram sinais únicos que permitiram a identificação de seis pares cromossômicos (1, 2, 3, 5, 7 e 8). Os sítios de DNAr e os BACs se mostraram conservados em ambas espécies, embora *P. watsoniana* tenha apresentado um sítio de DNAr extra no cromossomo 3, oposto ao BAC marcador. Os elementos Ty1-copia e Ty3-gypsy apresentaram um padrão disperso, embora o Ty1-copia tenha mostrado distribuição principalmente proximal. Apesar das diferenças nos tamanhos cromossômicos entre essas espécies e da presença de um sítio extra de DNAr em *P. watsoniana*, os dados sugerem conservação de sintenia entre essas espécies do subgênero *Passiflora*.

Palavras-chave: BAC. FISH. Mapeamento comparativo. Retrotransposons LTR. Ty1 - copia. Ty3 - gypsy.

ABSTRACT

Passiflora edulis Sims., *Passiflora alata* Curtis and *Passiflora watsoniana* Mast. belong to the *Passiflora* L. genus, subgenus *Passiflora*, being *P. edulis* e *P. alata* phylogenetically more closely related than *P. watsoniana*. This subgenus contains a group of species predominantly with $2n = 18$. where *P. watsoniana* is more phylogenetically distant than *P. alata* and *P. edulis*. The genus, however, has a karyotypic variability with species presenting $x = 6, 9, 10, 11$ or 12 , suggesting a possible syntenic break in the subgenus, with chromosome number conservation. In the present study, we constructed comparative cytogenetic maps for *P. alata* and *P. watsoniana* using fluorescent in situ hybridization of BAC clones that had been mapped in *P. edulis*, as well as 35S and 5S ribosomal DNA (rDNA) probes and three retroelements (Ty1-copia, Ty3-gypsy and LINE). BACs selected from *P. edulis* were mapped in *P. alata* and *P. watsoniana*, and showed single signals, allowing the identification of six chromosomes (1, 2, 3, 5, 7 and 8). The rDNA sites and the BACs remained conserved in both species, though *P. watsoniana* presented an extra rDNA on chromosome 3, with a BAC marker on the opposite arm. The LTR retrotransposons Ty1-copia and Ty3-gypsy presented a dispersed pattern, though the Ty1-copia show mainly proximal distribution. Despite the differences between these species and the presence to the extra rDNA site in *P. watsoniana*, the data suggests synteny conservation between these species from *Passiflora* subgenus.

Keywords: BAC. FISH. Comparative mapping. Retrotransposons LTR. Ty1- copia. Ty3 - gypsy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1	CITOGENÉTICA.....	11
2.1.1	Mapeamento citogenético.....	12
2.1.2	Sequências repetitivas.....	13
2.2	O GÊNERO <i>Passiflora</i>	14
2.2.1	Citogenética e evolução do gênero <i>Passiflora</i>	15
2.2.2	<i>Passiflora edulis Sims</i>	16
2.2.3	<i>Passiflora alata Curtis</i>	17
2.2.4	<i>Passiflora watsoniana Mast</i>	18
3	RESULTADOS.....	19
	3.1 MAPEAMENTO CITOGENÉTICO DE <i>Passiflora alata</i> e <i>Passiflora</i> <i>watsoniana</i> REVELA CONSERVAÇÃO DE SINTENIA NO SUBGÊNERO <i>Passiflora</i> (Passifloraceae).....	19
4	CONCLUSÕES.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

Passiflora L. é o maior gênero da família Passifloraceae Juss. ex Roussel, ordem Malpighiales, com 530 espécies de distribuição pantropical. Destas, 141 são nativas do Brasil e 60 são apropriadas para alimentação humana. O gênero teve origem no Eoceno há aproximadamente 42,9 milhões de anos (MA), e é composto por quatro subgêneros principais, sendo o subgênero *Passiflora* o maior deles com diversificação desde 25,94 MA (SADER *et al*, 2018). Por possuir espécies de relevância econômica, a caracterização citogenética das espécies de *Passiflora* é de suma importância, para compreender a evolução do gênero e, auxiliar em programas de melhoramento (SILVIA *et al*, 2005).

As espécies de *Passiflora* possuem cromossomos de tamanho e morfologia similares entre si, o que dificulta a identificação dos mesmos, levando a diferentes cariótipos propostos (SOUZA *et al*, 2003). A maioria das espécies do subgênero *Passiflora* possui $n = 9$ e dois sítios de DNA ribossomal (DNAr) 35S, como as espécies de importância econômica *P. edulis* e *P. alata*. Nesse mesmo subgênero, porém, em um clado filogeneticamente mais distante, estão espécies como *P. watsoniana*, que apresentam três sítios de DNAr 35S (MELO, 2003; SADER *et al*, 2018).

Em *P. edulis*, foram relatadas constrições secundárias nos pares cromossômicos 1, 2, 7 e 8, onde nos cromossomos 7 e 8 essas constrições coincidem com os sítios de DNA ribossomal 35S (relatado como a subunidade 18S pelos autores MIRANDA *et al*, 2008). Essas constrições são regiões parcialmente descondensadas do DNAr 35S que em prófase são associadas ao nucléolo, e por isso, também chamadas de Regiões Organizadoras do Nucléolo (RONs). Embora, em algumas espécies, tenham sido relatadas constrições não relacionadas às RONs (HAMMETTI *et al*, 1992). Em outros estudos, os sítios de DNAr 35S foram observados nos cromossomos 7 e 9 (MELO, 2003) ou 8 e 9 (SILVIA *et al*, 2005). Em *P. alata*, os sítios de DNAr 35S foram relatados para os cromossomos 5 e 8 e o DNAr 5S para o braço curto do cromossomo 3 ou 4 (MELO, 2003).

O comprimento haploide do genoma de *P. alata* é de 22.88 μm , sendo os cromossomos maiores os de número 1 e 2, submetacêntrico e metacêntrico, respectivamente. O cromossomo 9, metacêntrico, possui um comprimento absoluto de 1.98 μm , relativamente maior quando comparado às outras espécies do gênero *Passiflora* (MELETTI *et al*, 2003). As diferenças entre os tamanhos cromossômicos,

bem como possíveis diferenças na localização das RONS, sugere que alterações cariotípicas, que resultaram em diferentes números cromossômicos no gênero, podem ter ocorrido no subgênero *Passiflora*, levando à quebra de sintenia, ou seja, ao não compartilhamento das mesmas sequências de DNA nos mesmos cromossomos, e de colinearidade, ou seja, na ordem dessas sequências no cromossomo (TANG *et al*, 2008). A abordagem citogenética mais utilizada a fim de averiguar conservação de sintenia e colinearidade entre espécies relacionadas é por meio da técnica de BAC-FISH, utilizando os mesmos BACs nas diferentes espécies de interesse.

Com isso, o objetivo do presente trabalho é comparar citogeneticamente duas espécies do subgênero *Passiflora*, *P. alata* e *P. watsoniana*, através da construção de mapa citogenéticos utilizando BAC-FISH. Para isso, foram usados os mesmos marcadores do mapa estabelecido para *P. edulis*, além da análise de distribuição de três elementos repetitivos. Desse modo, busca-se entender se a manutenção do número $n = 9$ ocorreu com ou sem quebra na sintenia dentro desse subgênero.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CITOGENÉTICA

A citogenética compreende o estudo dos cromossomos, isolados ou em conjunto, distendidos ou condensados, tanto no que se refere à sua morfologia, função, organização e replicação, quanto a sua variação e evolução (GUERRA, 1988). Os estudos cromossômicos permitem caracterizar os cariótipos quanto ao comprimento absoluto, posição dos centrômeros, presença de satélites e constrições secundárias (MAYEDA, 1997). Além disso, a partir da análise do cariótipo de espécies relacionadas, é possível observar variações inter e intraespecíficas que podem ser características de determinado gênero ou espécie (SOUZA; PEREIRA; VIEIRA, 2008). Dessa forma, esses estudos citogenéticos têm contribuído significativamente para diversas áreas, tais como a genética, evolução, sistemática e melhoramento de plantas.

O uso de técnicas convencionais permite estabelecer um cariótipo baseado no número e morfologia cromossômica e até na presença de constrições secundárias, gerando fórmulas cariotípicas para as espécies (MERCADO; DELGADO, 1998; MIRANDA *et al*, 2008).

Entretanto, essas colorações marcam uniformemente os cromossomos sem diferenciar nenhuma região específica, e em grupos com cromossomos muito similares, esse tipo de técnica não possibilita a identificação dos mesmos (SILVIA *et al*, 2005). O bandeamento cromossômico, especialmente o bandeamento G, se mostrou eficiente para este tipo de identificação em animais. Todavia, o bandeamento G não se mostrou eficiente em plantas, talvez devido à forte compactação dos cromossomos de plantas durante a mitose, inviabilizando a visualização das bandas (GREILHUBER, 1977).

Uma das técnicas de coloração diferencial mais utilizadas para caracterização cromossômica em plantas é o bandeamento com os fluorocromos CMA (cromomicina A3) e DAPI (4', 6-diamidino- 2-fenilindol). Os fluorocromos CMA e DAPI marcam as regiões ricas em GC e AT, respectivamente e o bandeamento com esses fluorocromos é empregado para análise da heterocromatina (GUERRA, 2000), sendo útil para investigar sua distribuição e padrões encontrados entre espécies relacionadas (ALMEIDA *et al*, 2016) ou entre espécies de gêneros diferentes (CORDEIRO *et al*, 2017).

O desenvolvimento da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) marca a transição da citogenética clássica para a citogenética molecular. A técnica consiste na marcação de uma sequência de DNA como sonda e sua posterior localização em preparações citológicas (JIANG; GILL, 2006). Dentre diversas abordagens que podem ser feitas com a técnica, a distribuição de sítios de DNA ribossomal é uma das mais usadas, seja para analisar a variabilidade desses sítios entre espécies relacionadas (SOUZA; PEREIRA; VIEIRA, 2008), sua relação com regiões heterocromáticas (CABRAL; FELIX; GUERRA, 2006) ou para investigar o número cromossômico básico de um gênero (MELO, 2003). Uma das mais importantes aplicações da FISH é a construção de mapas citogenéticos (SILVA *et al*, 2011; FONSÊCA *et al*, 2010).

2.1.1 Mapeamento citogenético

A hibridização fluorescente *in situ* é um método amplamente utilizado para localizar sequências de DNA em cromossomos, viabilizando a construção de mapas citogenéticos, ordenando contigs de clones de DNA, como os BACs, e estabelecendo sua orientação (KARAFIÁTOVÁ *et al*, 2013). Dentre as abordagens usadas para construir um mapa físico estão: 1) a montagem de contigs de DNA por *fingerprinting* dos clones de DNA genômico; 2) a ancoragem de marcadores mapeados geneticamente em cromossomos específicos ou 3) a localização de clones de DNA diretamente nos cromossomos por FISH, que são também chamados de mapas citogenéticos (JIANG; GILL, 2006).

Os mapas citogenéticos são geralmente construídos com BACs, vetores bacterianos que carregam insertos de sequências genômicas de aproximadamente 100 a 150 Kb (kilopares de bases), sendo estes os vetores mais utilizados para construir bibliotecas genômicas. Essas bibliotecas consistem num conjunto de milhares de BACs que contêm o genoma da espécie fragmentado e clonado. Os mapas físicos apresentam esses BACs de forma ordenada, de modo que representam a distância entre genes, marcadores ou sequências de DNA em pb (pares de bases) (ARIYADASA; STEIN, 2012). O mapa físico difere do mapa genético, pois este último reflete as distâncias relativas entre marcadores a partir de frequências de recombinação, medidas em cM (PEDROSA-HARAND; GUERRA, 2004). Na ausência de um genoma completo montado para a espécie, a integração de um mapa genético e físico é um importante recurso para a melhor compreensão da estrutura e função do genoma (GARDINER,

2004).

Mesmo quando não há mapa físico de BACs disponível para a seleção de conjuntos de BACs para pintar o cromossomo inteiro, é possível isolar um BAC que contenha uma sequência de interesse, marcá-lo como sonda e localizá-lo no cromossomo através da FISH (JIANG; GILL, 2006). Assim, a FISH de BACs se constitui numa estratégia amplamente empregada para reconhecer os cromossomos individualmente em plantas por meio de marcadores cópia única cromossomo-específicos. Além de identificar pares cromossômicos individualmente (FONSÊCA *et al*, 2010), clones de BACs de uma espécie podem ser usados em espécies relacionadas para observar a relação evolutiva entre elas (CHENG, 2001; SZINAY *et al*, 2012; TANG *et al*, 2008) ou ainda detectar rearranjos que tenham ocorrido entre espécies relacionadas (BETEKHTIN; JENKINS; HASTEROK, 2014; JIANG; GILL, 2006), revelando a evolução entre os cariótipos. Além disso, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com BACs individuais possibilita o estudo de sintonia e colinearidade entre espécies relacionadas (LYSAK, 2005; SZINAY *et al*, 2012).

Os estudos com BAC-FISH são realizados particularmente em espécies de importância econômica (para as quais em geral há biblioteca BACs disponíveis) ou espécies com genoma pequeno (XIONG; KIM; PIRES, 2010). Isso porque um potencial problema com a técnica são as sequências repetitivas que podem mascarar a localização de sequências únicas, especialmente em espécies de maior genoma. Entretanto, em estudos com trigo (ZHANG *et al*, 2004) e feijão (FONSÊCA *et al*, 2010), clones de BACs com sinais repetitivos foram usados e constituíram marcadores para determinadas regiões cromossômicas, como o centrômero, e para identificação dos cromossomos individualmente.

2.1.2 Sequências repetitivas

O genoma dos organismos é composto por tipos distintos de sequências de DNA, cópia única ou DNA repetitivo. Os genomas dos eucariotos contém grandes porções de frações repetitivas, em sua maioria, elementos transponíveis. Estes são um dos responsáveis pela grande variação do tamanho do genoma em plantas (LEE; KIM, 2014). A porção repetitiva do genoma pode estar dispersa ou repetida em tandem (RAMA RAO *et al*, 2010). Baseado em seus mecanismos de transposição, a fração dispersa pode ser dividida em duas classes, transposons e retrotransposons (LEE; KIM,

2014). Em plantas, a maioria dos elementos repetitivos são retrotransposons do tipo LTR, sendo grande parte dispersa ao longo dos cromossomos.

Retrotransposons constituem a maior classe de elementos transponíveis e podem ser classificados em LTR (como os *Ty1-Copia* e *Ty3-Gypsy*) e não-LTR (principalmente os LINES, SINES) (KUMAR; BENNETZEN, 1999). Em milho, por exemplo, estima-se que esses retroelementos alcancem cerca de 85% do genoma (SCHNABLE *et al*, 2009). Esses elementos se encontram geralmente dispersos por todo o cromossomo, mas podem se associar a regiões específicas do genoma (HESLOP-HARRISON, 2000). Dessa forma, tanto sequências repetitivas dispersas como em tandem podem ser usadas na identificação cromossômica de plantas, auxiliando na caracterização citogenética e em estudos evolutivos dessas espécies (KATO *et al*, 2005; BEGUM *et al*, 2013).

22 O GÊNERO *Passiflora*

Passiflora L. é o maior gênero em número de espécies e o mais importante economicamente na família Passifloraceae, ordem Malpighiales, sendo a maioria nativa das Américas (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Destas, 141 são nativas do Brasil e 60 são apropriadas para alimentação humana (OLIVEIRA, 1994). São representadas por hábitos herbáceos, lianas e, mais raramente, árvores (HANSEN *et al*, 2006). A característica diagnóstica e restrita ao gênero é a corola filamentosa (JUDD, 1999). O gênero *Passiflora* se diversificou no Eoceno há aproximadamente 42,9 MA. O subgênero *Decaloba* se diversificou há 37,04 MA, enquanto *Passiflora* (25,94 MA) e *Astrophea* (20,59 MA) mostraram uma diversificação mais recente (SADER *et al*, 2018).

Muitas das espécies de *Passiflora* são polinizadas por insetos, como as mamangavas do gênero *Xylocopa* (CORBET, 1980; KOSCHNITZKE; SAZIMA, 1997). As espécies de *Passiflora* são cultivadas especialmente pelos frutos comestíveis e seu uso ornamental (VANDERPLANK, 1996). Além disso, a sua morfologia, como os atributos florais e foliares, é uma das mais variáveis dentro do grupo das angiospermas, e sugere coevolução com insetos polinizadores (MACDOUGAL, 1994). Baseado nessas estruturas morfológicas, especialmente florais, foram propostos quatro subgêneros para *Passiflora*, contra os 23 propostos anteriormente (FEUILLET; MACDOUGAL, 2003; KILLIP, 1938). Recentemente, a filogenia molecular proposta por (MUSCHNER *et al*, 2012) corroborou esta divisão do gênero em quatro subgêneros, além de propor um quinto subgênero, *Tryphostemmatoides*, formado por uma única espécie, *Passiflora*

tryphostemmatoides, anteriormente pertencente ao subgênero *Deidamioides*, considerada morfologicamente como um subgênero a parte (ESCOBAR, 1989).

O subgênero *Passiflora* é o maior e mais conhecido dentro do gênero por possuir espécies de importância econômica, tais como *P. edulis*, o maracujá azedo ou amarelo, e *P. alata*, o maracujá doce (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Algumas das características do subgênero são as flores grandes e com muitas séries de filamentos da coroa, sendo também o mais diversificado na América do Sul. *Decaloba* é o segundo maior subgênero, representado por trepadeiras herbáceas, flores pequenas (menos de 4 cm de diâmetro) com uma ou duas séries de filamento na coroa (MILWARD *et al*, 2010).

O subgênero *Deidamioides* é caracterizado por glândulas peciolares e pelo fato de as plantas jovens possuírem discos adesivos nas gavinhas que facilitam o hábito de trepadeiras, fazendo com que estas alcancem o dossel em florestas. O subgênero *Astrophea* está distribuído na América do Sul e Central, com a maioria das espécies no Brasil. É composto por lianas e árvores pequenas ou médias, pedúnculo com 1-5 flores rosas a púrpuras e vermelhas a alaranjadas (KOSCHNITZKE; SAZIMA, 1997; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

2.2.1 Citogenética e evolução do gênero *Passiflora*

A caracterização citogenética das espécies do gênero *Passiflora* é de suma importância, não apenas para auxiliar em programas de melhoramento, mas para compreender a evolução do gênero (SILVIA *et al.*, 2005). Aproximadamente 100 espécies do gênero possuem contagem cromossômica, e foi observado que essas espécies possuem variabilidade quanto ao número e tamanho cromossômico. Citogeneticamente, existem quatro grupos representados pelos números básicos $x = 6$, $x = 9$, $x = 10$ e $x = 12$, nos quais são distribuídas espécies com $2n = 12, 24$ e 36 ; $2n = 18, 72$; $2n = 20$; e $2n = 24$, respectivamente. Apesar de os subgêneros *Deidamioides* e *Astrophea* terem sofrido eventos de poliploidia, o número básico $x = 9$ proposto para o subgênero *Passiflora* surgiu provavelmente por disploidia ascendente.

Ou seja, a presença de dois ou três sítios de DNA r 35S no subgênero é devido a duplicação do sítio e não por causa de eventos de poliploidia (MELO, 2003; SADER *et al*, 2018). Por muito tempo, os estudos citogenéticos do gênero *Passiflora* foram restritos a técnicas convencionais, mas com o avanço de técnicas de bandeamento e hibridização *in situ* fluorescente, a caracterização do gênero foi significativamente

melhorada (VIANA; SOUZA, 2012).

Em estudo utilizando o bandeamento CMA/DAPI, observou-se que as regiões CMA positivas, em geral, coincidem com as constrições secundárias e sítios de DNA ribossomal 35S, à exceção de *Passiflora tricuspidis* Mast., por exemplo, que apresenta um par onde a banda CMA positiva não coincide com o DNAr 35S. Em outro trabalho foi observado, através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente, uma variabilidade no número de sítios de DNAr 5S e 35S. As espécies com $x = 6$ apresentaram um par de 35S e 5S, enquanto as espécies de $x = 9$ e $x = 10$ apresentaram mais de um par de 35S e apenas um par de 5S. O DNAr 5S se apresentou constante numericamente, exceto pela espécie diploide *P. foetida* L. e a tetraploide *P. suberosa* L. com quatro sítios, e a hexaploide *P. misera* Kunth com seis sítios. Apesar disso, a variabilidade de sítios de DNAr dentro do grupo com $x = 9$ foi limitada, e não constitui um bom marcador para esse grupo (MELO, 2003).

Em relação ao conteúdo de DNA, 73 espécies do gênero possuem quantificação, das quais 23 estão na base de dados do Kew Gardens (BENNET; LEITCH, 2012). As outras 50 espécies quantificadas mostraram uma variação significativa no tamanho do genoma entre as espécies de *Passiflora* (1C = 0,212 pg em *Passiflora organensis* e 2,208 pg em *Passiflora alata*), ou seja, uma variação de mais de 10 vezes entre a espécie de menor e maior tamanho, respectivamente. *Passiflora edulis*, ou maracujá-azedo, a espécie de maior importância do gênero, apresentou tamanho 1C = 1,258 pg (YOTOKO *et al.*, 2011). Entretanto, o maior tamanho do genoma reportado para o gênero é de *P. quadrangulares*, com estimativa de 2C = 5,36 pg (SOUZA *et al.*, 2004).

2.2.2 *Passiflora edulis* Sims

Passiflora edulis, o maracujá-azedo, é uma espécie que pertence ao subgênero *Passiflora*, com $2n = 18$ (VIANA; SOUZA, 2012). A espécie possui caule cilíndrico e glabro, folhas trilobadas e glabras, flores solitárias com pétalas brancas e filamentos na cor púrpura na base. O fruto é globóide e sem pelos (ARAÚJO; ALVES, 2013). O comprimento dos cromossomos metafásicos em *P. edulis* variou entre 3,16 μm (par 1) e 1,82 μm (par 9), com um comprimento haplóide total de 22,66 μm (SILVIA *et al.*, 2005).

Os cromossomos similares (meta e submetacêntricos) dessa espécie dificultam suas identificações, com diferentes cariótipos propostos. Foram observadas constrições

secundárias em quatro pares cromossômicos, na região subterminal do braço curto nos cromossomos 2 e 7, e na região subterminal do braço longo nos cromossomos 1 e 8. Nos cromossomos 7 e 8 essas constrictões coincidem com os sítios da subunidade de DNA ribossomal 18S (MIRANDA *et al*, 2008). Em outros estudos, os sítios de DNAr 35S foram observados nos cromossomos 7 e 9 (MELO, 2003) ou nos cromossomos 8 e 9 (SILVIA *et al*, 2005).

Recentemente, foi construída para *P. edulis* uma biblioteca genômica com 82.944 clones de BACs, com tamanho médio dos insertos de 108 kb (SANTOS *et al*, 2014). Destas, 5.974 sequências de regiões terminais de BACs (BES) foram analisadas, sendo usadas para fornecer informações sobre microssintenia com outros genomas sequenciados, composição do genoma, densidade gênica e ocorrência e distribuição de sequências repetitivas como elementos transponíveis (TEs) e sequências de microssatélites (SSRs). Oito BACs foram selecionados da biblioteca com genes isolados do maracujá e utilizados no mapeamento cromossômico da espécie. Destes, quatro apresentaram sinal único em FISH e foram mapeados nos cromossomos 1 (gene ERS), 3 (gene ACCO) e 4 (genes G3PD e CYCD1). Quatro BACs (genes EMB, LOX, NDID e MIPS) apresentaram sinais de hibridização subteloméricos, pericentroméricos ou dispersos, indicando a presença de DNA repetitivo. Com isso, o potencial dessa biblioteca BAC na construção de um mapa físico foi demonstrado (SANTOS *et al*, 2014) e a mesma foi usada para propor um mapa citogenético para a espécie utilizando 10 BACs (SADER, 2016).

2.2.3 *Passiflora alata* Curtis

A espécie *P. alata*, ou maracujá-doce, é uma espécie de importância econômica, tanto pelo valor ornamental de sua flor, como pelo fruto comestível (PEREIRA *et al*, 2013). A espécie está distribuída em vários estados brasileiros, especialmente na Mata Atlântica e em áreas próximas a costa (GBIF, 2017). Apresenta caule quadrangular, folhas inteiras, glabras e ovais. Possui dois pares de glândulas na base do pecíolo, flores pêndulas e solitárias, pétalas avermelhadas, corona filamentosa e rósea, com séries externas variegadas. Fruto obovóide e glabro (ARAÚJO; ALVES, 2013). O conteúdo de DNA estimado por citometria de fluxo para *P. alata* é de $1C = 2,208$ pg (YOTOKO *et al*, 2011).

A espécie é auto-incompatível (FERREIRA *et al*, 2010) e seu cariótipo possui $2n = 2x = 18$ com fórmula cariotípica $2n = 7M + 2SM$, onde os dois maiores pares são submetacêntricos. O comprimento haploide do genoma é de 22,88 μm . Os cromossomos 8 e 9 são metacêntricos, e o cromossomo 9 possui um comprimento absoluto de 1,98 μm , relativamente maior quando comparado às outras espécies do gênero (MELETTI *et al*, 2003). A espécie apresenta dois sítios de DNA ribossomal (DNAr) 35S nos pares 7 e 8 e um sítio de DNAr 5S no par 5 (MELO, 2003). Não há correspondência, no entanto, entre as numerações cromossômicas dos diferentes trabalhos ou entre os cromossomos de *P. alata* e *P. edulis*, não sendo possível avaliar se os cromossomos portadores dos sítios de DNAr são os mesmos nas diferentes espécies.

2.2.4 *Passiflora watsoniana* Mast

A espécie *P. watsoniana*, o maracujá do mato, é uma liana endêmica da Mata Atlântica do Brasil e suas flores são usadas para ornamentação. A espécie apresenta um caule cilíndrico e glabro, folhas trilobadas, flores solitárias, pétalas e filamentos na cor lilás. O fruto é globóide e glabro (ARAÚJO; ALVES, 2013). *Passiflora watsoniana* possui $2n = 18$ e seu conteúdo de DNA, estimado por citometria de fluxo é de $2C = 1,305$ pg (YOTOKO *et al*, 2011). A espécie pertence a um subclado mais distante de *P. edulis* e *P. alata* (Sader *et al*, 2018), junto com outras espécies que possuem três sítios de DNAr 35S (MELO, 2003).

3 RESULTADOS

31 MAPEAMENTO CITOGENÉTICO DE *Passiflora alata* E *Passiflora watsoniana* REVELA CONSERVAÇÃO DE SINTENIA NO SUBGÊNERO *Passiflora* (Passifloraceae)

Yhanndra Dias¹, Mariela Sader¹, Carla Munhoz², Maria Lúcia Carneiro Vieira²,
Andrea Pedrosa-Harand^{1,3}

¹ Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal – Centro de Biociências
– Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco – Brasil.

² Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz –
Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo – Brasil.

³ Autor para correspondência: andrea.pedrosaharand@pq.cnpq.br

Resumo

O gênero *Passiflora* L. apresenta grande variabilidade em números cromossômicos ($2n = 12, 18, 20, 24, 36, 72$) e na distribuição de sítios de DNA ribossomal. A maioria das espécies do subgênero *Passiflora*, no entanto, possui $n = 9$ e dois sítios de DNAr 35S, como as espécies de importância econômica *P. edulis* e *P. alata*. Espécies de um grupo filogeneticamente mais distante nesse mesmo subgênero, que inclui *P. watsoniana*, possuem três sítios de DNAr 35S. Essa variabilidade cariotípica do gênero *Passiflora* sugere, portanto, possível quebra de sintenia também no subgênero, porém com manutenção do número cromossômico na maioria de suas espécies. Para investigar a sintenia entre três espécies deste subgênero, foi realizado um mapeamento citogenético comparativo utilizando os mesmos BAC marcadores previamente estabelecidos para *P. edulis* em *P. alata* e *P. watsoniana*. Além disso, foi investigada a distribuição de sítios de DNAr 35S e 5S e dos elementos repetitivos Ty1-copia e Ty3- gypsy. Os nove BACs usados revelaram sinais cópia única, todos em regiões terminais ou subterminais, identificando os pares cromossômicos 1, 2, 3, 5, 7 e 8 nas três espécies. Não houve quebra de sintenia entre BACs do mesmo cromossomo ou em relação aos sítios de DNAr, exceto pelo sítio adicional de DNAr 35S observado no cromossomo 3 apenas em *P. watsoniana*. Os elementos repetitivos do tipo retrotransposons LTR Ty1-copia e Ty3- gypsy apresentaram padrões dispersos, mais proximal ou uniforme, respectivamente. Os resultados encontrados sugerem conservação de sintenia entre essas espécies, com aumento de sequências repetitivas principalmente nas regiões proximais em concordância com o aumento do genoma.

Palavras-chave: BAC, FISH, Mapeamento comparativo, retrotransposons LTR, Ty1-copia, Ty3-gypsy.

Introdução

Passiflora apresenta 525 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da América, África e Ásia (Ulmer; MacDougal, 2004). Suas espécies são representadas por hábitos herbáceos, lianas e, mais raramente, árvores (Hansen *et al*, 2006). Aproximadamente 140 espécies são nativas do Brasil e 60 são apropriadas para alimentação humana, além de serem usadas para ornamentação e na fabricação de fármacos (Oliveira *et al*, 1994). Para MacDougal (1994) nenhum outro grupo de angiospermas possui tamanha diversidade foliar, com ampla variação de cores e tamanhos das flores, como o gênero *Passiflora*, fato que provavelmente está relacionado a insetos polinizadores. No Brasil, entre as espécies de maior interesse comercial do gênero, estão *Passiflora edulis* Sims, o maracujá-azedo, e *P. alata* Curtis, o maracujá doce (Souza; Melleti, 1997). Ambas pertencem ao subgênero *Passiflora*, o maior com 240 espécies (Hansen *et al*, 2006).

Análises filogenéticas, aliadas às características morfológicas, permitiram delimitar quatro subgêneros: *Passiflora* (240 espécies), *Decaloba* (220), *Astrophea* (57) e *Deidamioides* (13) (Feuillet; MacDougal, 2004; Hansen *et al*, 2006), contra os 22 ou 23 subgêneros propostos por Killip (1938). Mais recentemente, com base em análises filogenéticas, dois novos pequenos subgêneros foram propostos: *Tetrapathea* (Krosnick *et al*, 2009) e *Tryphostematoides* (Muschner *et al*, 2012). O gênero se diversificou no Eoceno há aproximadamente 42,9 MA. *Decaloba* se diversificou há 37,04 MA, enquanto *Passiflora* (25,94 MA) e *Astrophea* (20,59 MA) mostraram uma diversificação mais recente (Sader *et al*, 2018).

No gênero *Passiflora*, cerca de 100 espécies possuem contagem cromossômica. Os cariótipos são em geral simétricos, com cromossomos metacêntricos a submetacêntricos (De Melo *et al*, 2001). Em estudo recente foi feita a reconstrução para número básico do gênero *Passiflora*, onde $x = 6$ foi obtido como número ancestral mais provável. Os subgêneros possuem números básicos distintos, com $x = 6$ para *Decaloba*, $x = 9$ para *Passiflora* e $x = 12$ para *Deidamioides* e *Astrophea* (Sader *et al*, 2018). O complemento cromossômico total de 6 espécies estudadas do subgênero *Passiflora* variou de 32,9 a 62,3 μm (Souza *et al*, 2003) e o tamanho do genoma apresentou uma grande variação, de $1\text{C} = 0.212 \text{ pg}$ em *P. organensis* (*Decaloba*) até 5,36 pg em *P. quadrangularis* (*Passiflora*) (Souza *et al*, 2004; Yotoko *et al*, 2011).

As espécies de interesse agrônômico pertencem ao subgênero *Passiflora* L. Exceto *P. foetida* ($2n = 20$), todas possuem $2n = 18$ com cromossomos de tamanho e morfologia similares, o que dificulta a identificação dos mesmos, levando a diferentes cariótipos propostos (Souza *et al*, 2003). O comprimento dos cromossomos metafásicos em *P. edulis* variou entre 3,16 μm (par 1) e 1,82 μm (par 9), com um comprimento haplóide total de 22,66 μm (Silvia *et al*, 2005). Foram observadas constrições secundárias em quatro pares cromossômicos, na região subterminal do braço curto nos cromossomos 2 e 7, e na região subterminal do braço longo nos cromossomos 1 e 8. Nos cromossomos 7 e 8 essas constrições coincidiram com os sítios da subunidade de DNA ribossomal 18S (Miranda *et al*, 2008). Em outros estudos, os sítios de DNAr 35S foram observados nos cromossomos 7 e 9 (Melo, 2003) ou nos cromossomos 8 e 9 (Silvia *et al*, 2005).

Passiflora alata possui $2n = 2x = 18$ e o cariótipo da espécie é composto por dois pares de cromossomos submetacêntricos (SM, 1 e 6), e sete pares metacêntricos, dos quais dois pares possuem satélite (4 e 7), com fórmula cariotípica $2n = 7M+2SM$. O comprimento haploide do genoma é de 22,88 μm (Melletti *et al*, 2003). Já *P. watsoniana* ($2n = 18$), com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, pertence a um subclado mais distante de *P. edulis* e *P. alata*, junto com outras espécies que possuem três sítios de DNAr 35S (Sader *et al*, 2018; Melo *et al*, 2003). As duas espécies têm uma diferença considerável com relação ao tamanho do genoma, onde *P. alata* tem $1C = 2,208$ pg e *P. watsoniana* $1C = 1,305$ pg (Yotoko *et al*, 2011). As diferenças na localização das RONS entre os cromossomos sugere que alterações cariotípicas, que resultaram em diferentes números cromossômicos no gênero, podem ter ocorrido no subgênero *Passiflora*, levando à quebra de sintenia e colinearidade mesmo quando não houve alteração de número cromossômico.

Uma estratégia que auxilia no entendimento dos eventos de evolução cariotípica entre espécies relacionadas é a construção de mapas citogenéticos comparativos utilizando marcadores BACs (cromossomos artificiais de bactérias) (Lysak, 2005; Szinay *et al*, 2012). Os BACs são vetores bacterianos que carregam insertos de sequências de aproximadamente 100 a 150 kb, que podem ser localizados no cromossomo através da FISH (Jiang; Gill, 2006). Clones de BACs selecionados a partir do genoma de uma espécie podem ser utilizados para a identificação de pares cromossômicos individualmente (Cheng, 2001), ou ainda para detectar rearranjos que tenham ocorrido entre espécies e gêneros relacionados (Peters *et al*, 2012), permitindo

avaliar o grau de conservação de sintenia entre elas (Ma *et al*, 2010). Algumas sequências repetitivas também são utilizadas na construção de mapas citogenéticos. Em *Corchorus*, por exemplo, fragmentos do retroelemento Ty3-Gypsy foram usados em duas espécies na construção de um mapa citogenético (Begum *et al*, 2013).

No presente trabalho, BACs correspondendo a regiões gênicas da biblioteca construída para *P. edulis* (Santos *et al*, 2014) e previamente mapeados citogeneticamente como cópia única nesta espécie (Sader, 2016) foram usados como sondas para a construção de um mapa físico para *P. alata* e *P. watsoniana* por BAC-FISH. Também foram usados elementos repetitivos Ty1-Copia, Ty3-Gyps y e LINE de *P. edulis*, na busca de um padrão de distribuição que pudesse ser útil na identificação dos cromossomos das espécies estudadas. Dado o tempo de divergência entre as espécies de *Passiflora* e a alta variabilidade cromossômica do gênero, o mapeamento citogenético destas espécies objetivou avaliar o grau de sintenia e colinearidade entre as três espécies do subgênero *Passiflora*, testando a hipótese que houve rearranjos estruturais no grupo, apesar da conservação de número cromossômico.

Materiais e métodos

Materiais

Mudas e sementes de *Passiflora alata* (genótipo SV3) e *P. edulis* (IAPAR-123x06) foram obtidas do banco de germoplasma da ESALQ-USP, Piracicaba – SP. Um exemplar de *Passiflora watsoniana*, coletado no município de Areia – Paraíba, foi gentilmente cedido pelo Prof. Marcelo Guerra. As plantas foram mantidas no jardim experimental do Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal, do Departamento de Botânica da UFPE.

Preparação das lâminas

Para as preparações citológicas, raízes de *P. alata*, *P. edulis*, e *P. watsoniana* cultivadas em vasos foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8HQ) por 5 h a 18°C, fixadas em Carnoy (etanol:ácido acético 3/1 v/v) por 2 h e armazenadas a -20° C. As preparações mitóticas foram feitas pelo método de secagem ao ar (De Carvalho; Saraiva, 1993) após digestão enzimática (2% celulase Onozuka, 20% pectinase Sigma) por 90 min a 37°C. As melhores lâminas foram selecionadas após coloração com 2

□g/ml de DAPI (4',6- diamidino-2-fenilindol) em glicerol (1:1, v/v) e descoradas com Carnoy por 30 min, etanol 96% por 1h e secadas ao ar.

Obtenção das sondas

Foram usadas sondas de sequências repetitivas e únicas para a FISH. Para sondas repetitivas, foram utilizadas três sequências parciais de retrotransposons de diferentes famílias (*Ty1-Copia*, *Ty3-Gypsy* e *LINE*) identificados como as mais abundantes de cada grupo pela análise das BES (*BAC End Sequences*) da biblioteca de BACs de *P. edulis* (Santos *et al*, 2014). Tais sequências foram amplificadas por PCR com o uso de *primers* específicos (Sader, 2016). Além disso, também foram utilizadas sondas para o DNA ribossomal 5S e 35S, localizados, respectivamente, com as sondas D2 de *Lotus japonicus* (Pedrosa *et al*, 2002) e pTa71 de *Triticum aestivum* (Gerlach; Bedbrook, 1979).

Para sondas únicas, foram utilizados nove BACs (79I13, 93G04, 125I23, 134H15, 164K17, 164M13, 173B16, 214H11, 216B22) do mapa de *P. edulis* (Sader 2016), extraídos por meio do Qiagen Plasmid Midi Kit. Outros nove BACs da mesma biblioteca também foram testados em *P. edulis* em busca de marcadores adicionais (61D06, 69H24, 69016, 111F12, 152I06, 195F4, 198H23, 215I08). O DNA foi quantificado em gel de agarose 1% (p/v) após uma digestão com *Hind* III e com *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific). A marcação das sondas foi feita por *nick translation* com enzimas separadas (DNase I, Thermo Scientific, e DNA polymerase I, Invitrogen) ou kit (Roche ou Invitrogen) com Cy3- dUTP (GE) ou digoxigenina 11-dUTP (Roche, para DNAr 35S), segundo Wanzenbock *et al*, (1997) ou seguindo as recomendações do fabricante, respectivamente.

Hibridização in situ fluorescente

A hibridização *in situ* fluorescente com BACs foi realizada conforme descrito por Fonsêca *et al*, (2010). A mistura de hibridização, composta por 50% (v/v) de formamida, 10% (p/v), dextran sulfato, 2× SSC e 5 ng/μl de sonda foi desnaturada a 75°C por 10 min. As lâminas foram desnaturadas por 5 min a 75°C e hibridizadas por 48 h para sondas de BAC e 24 h para sequências repetidas, a 37° C em câmara úmida. Quando necessário, foi utilizado o DNA genômico total fragmentado de *Passiflora edulis* para bloqueio de sequências repetitivas em BACs. O DNA genômico foi extraído

pelo protocolo de Weising (1995), fragmentado em água fervente, quantificado no Nanodrop, e adicionado na mistura de hibridização, em uma concentração de 50-100× a concentração da sonda. A estringência final foi de 76%. A sonda de DNAr 35S foi detectada com anticorpo primário anti-digoxigenina produzida em ovelha, conjugada com FITC (Roche) e o sinal amplificado com o anticorpo secundário contra anti-digoxigenina de ovelha produzida em coelho conjugada com FITC (Serotec). As lamínas foram montadas em Vectashield contendo DAPI (2µg/ml).

Análise dos dados

As imagens foram capturadas em microscópio de epifluorescência Leica, utilizando o software Leica Las-AF. A sobreposição, o processamento das imagens para brilho e contraste e as medições dos cromossomos e sinais foram realizadas usando Adobe Photoshop[®] CS3. Para construção dos idiogramas, foram medidas cinco células em que os cromossomos 1, 2, 3, 5, 7 e 8 foram identificados com marcadores BAC específicos. Como o cromossomo 1 apresenta uma contração distendida na região terminal do braço longo na maioria das células de *P. alata*, esse cromossomo foi medido sem incluir a contração e a mesma está indicada no ideograma de forma esquemática. Os cromossomos foram classificados de acordo com sua razão de braços segundo Guerra (1988). Para medições da posição dos sinais de cada BAC ao longo do cromossomo foram medidas de 14 a 20 cromátides selecionadas por BAC. As medições foram feitas conforme descrito por Fonsêca et al. (2010). Os cromossomos de *P. alata* e *P. watsoniana* foram identificados com os marcadores cromossomo-específicos de *P. edulis* e numerados de acordo com a homologia apresentada, independentemente de seu tamanho.

Resultados

Passiflora alata e *P. watsoniana* apresentaram $2n = 18$ com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, cujas fórmulas cariotípicas foram $2n = 16M+2SM$ para *P. alata* e $2n = 12M+6SM$ para *P. watsoniana*. O 7º maior cromossomo de *P. alata*, e o 1º, 3º e 6º maiores cromossomos de *P. watsoniana* foram submetacêntricos. O 2º maior par cromossômico de *P. alata*, aparentemente submetacêntrico, foi classificado como metacêntrico devido a sua razão de braços ($r = 1,486$).

Mapeamento de BACs

Os marcadores de cópia única cromossomo-específicos disponíveis para *P. edulis* foram usados para o mapeamento citogenético comparativo das espécies, exceto os BACs 164K17 e 134H15 em *P. watsoniana* (Figura 1). Todos os BACs marcadores evidenciaram sinal único nas regiões distais dos cromossomos, permitindo a identificação dos pares homeólogos 1, 2, 3, 5, 7 e 8 em *P. alata* e *P. watsoniana* (Figuras 1 e 2). Os cromossomos 4, 6 e 9 não possuem BAC marcador em *P. edulis*. O BAC 164M13 precisou de DNA bloqueador em *P. edulis*, mas evidenciou sinal único em *P. alata* e *P. watsoniana* sem a presença de bloqueio. Já o BAC 134H15 também precisou de DNA bloqueador concentrado em 50× em *P. alata*.

Os resultados obtidos para os cromossomos 1, 2, 5, 7 e 8 foram semelhantes para ambas espécies. No braço longo do par 1 (segundo maior par em *P. alata* e *P. watsoniana*, metacêntrico em ambas) foram mapeados os BACs 93G04, 134H15 e 164K17 em *P. alata* (Figura 1a, b) e o BAC 93G04 em *P. watsoniana* (Figura 1c). Em *P. alata*, os BACs 93G04 e 134H15 se mostraram praticamente colocalizados, sendo o 93G04 mais proximal e o 164K17 o mais terminal dos três (Figura 3). Para o cromossomo 2 (maior par, submetacêntrico em *P. watsoniana* e quase submetacêntrico em *P. alata*, $r = 1,486$) foram mapeados os BACs 216B22 no braço curto e 79I13 no braço longo (Figura 1e).

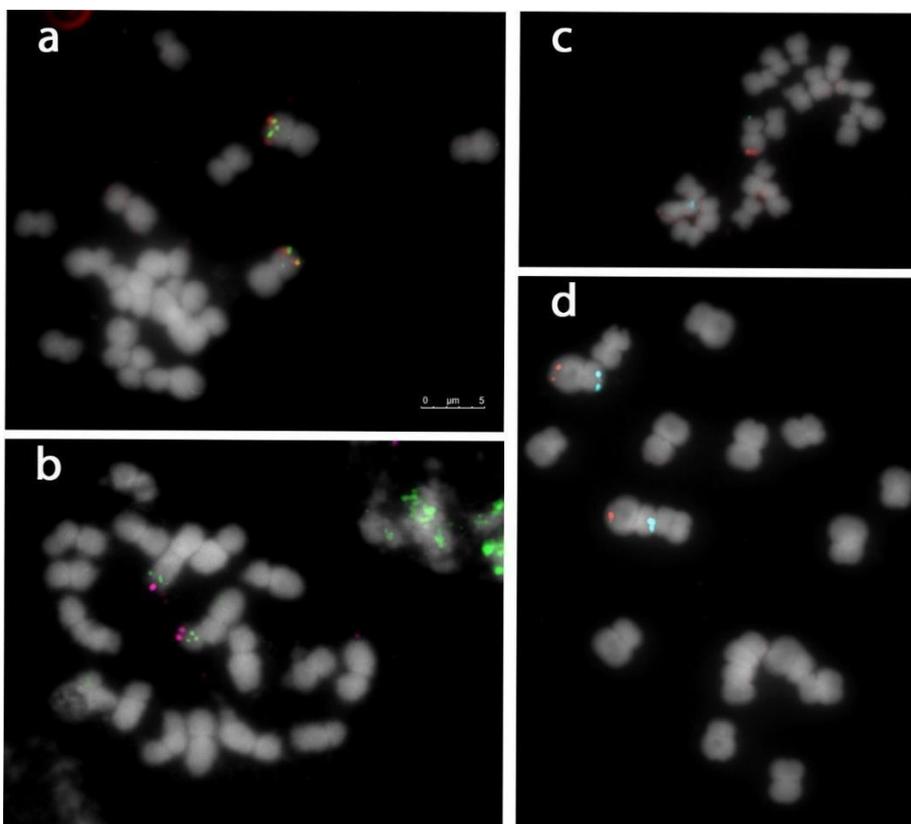


Figura 1 – Mapeamento dos cromossomos 1 e 2 em *Passiflora alata* (a, b, d) e *P. watsoniana* (c). (a) Cromossomo 1 – BACs 164K17 e 93G04; (b) Cr. 1 – BACs 134H15 e 93G04; (c, d) Cr. 2 – BACs 216B22 e 79I13.

Nas duas espécies foi observado que os cromossomos portadores de DNAr 5S e 35S têm os mesmos BACs no braço oposto. No braço curto do 5 (quinto maior par, metacêntrico) foi mapeado o BAC 125I23, estando o DNAr 5S em posição intersticial no braço oposto deste mesmo cromossomo (Figura 2a, c; Figura 3). No braço curto do cromossomo 7 em *P. watsoniana* (metacêntrico) e *P. alata* (submetacêntrico) foi mapeado o BAC 173B16 com um sítio de DNAr 35S terminal no braço oposto, longo, nas duas espécies (Figura 2b, f; Figura 3). No braço longo do cromossomo 8 (oitavo maior par, metacêntrico) foi mapeado o BAC 164M13 com o sítio de DNAr 35S localizado em posição terminal no braço curto, oposto ao BAC (Figura 2b, f; Figura 3). *Passiflora watsoniana* possui um par com sítio extra de DNAr 35S no braço longo do cromossomo 3 (terceiro maior em *P. watsoniana*, metacêntrico), que contém o BAC 214H11 no braço oposto (Figura 2e). Em *P. edulis* e *P. alata*, o cromossomo 3 (quarto maior par em *P. alata*, metacêntrico), apresenta apenas o BAC 214H11 no braço curto (Figura 2d).

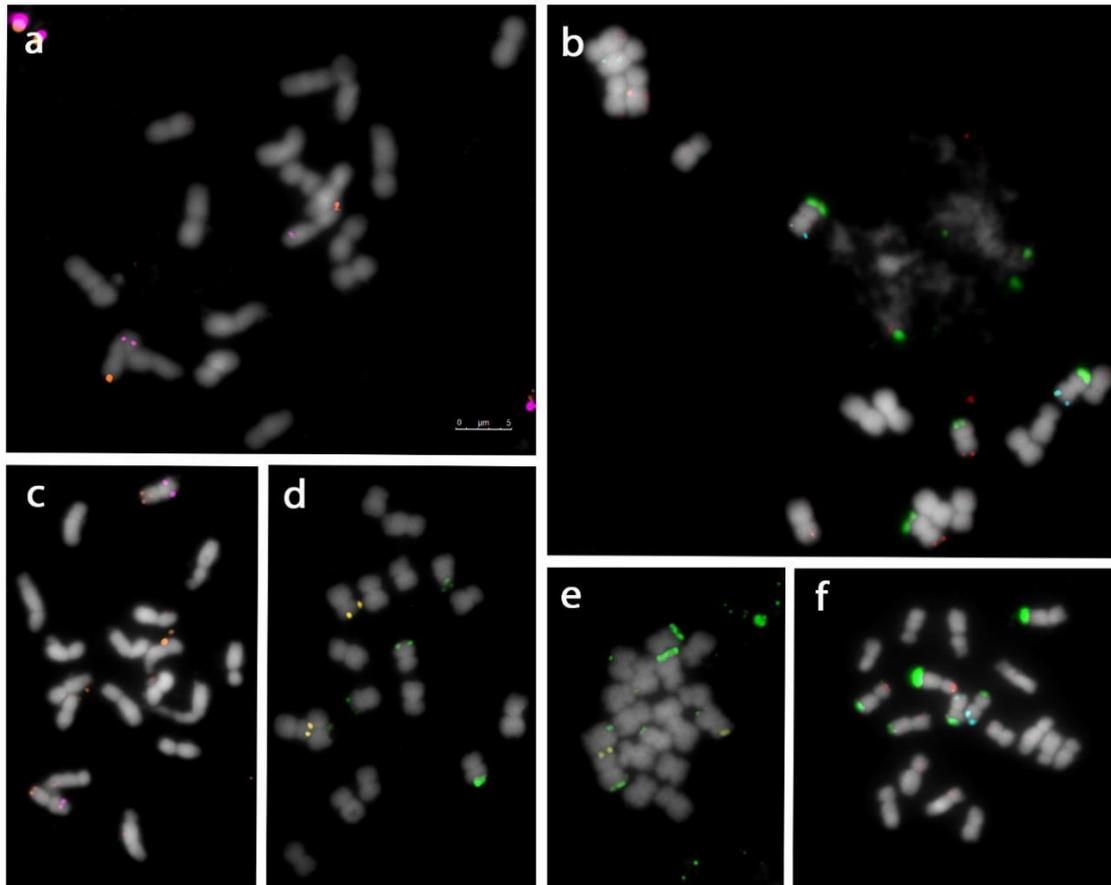


Figura 2 – Mapeamento dos cromossomos portadores de DNAr 5S (a, c) e 35S (b, d-f) em *P. alata* (a, b, d) em *P. watsoniana* (c, e, f). Cromossomo 3 – BAC 214H11; Cr. 5 – BAC 125I23; Cr. 7 – BAC 173B16; Cr. 8 – BAC 164M13

Todos os BACs foram localizados nas regiões terminais dos braços cromossômicos. Hibridizações adicionais com mais de um BAC foram feitas para confirmar que não houve quebra de sintonia entre as espécies. Os cromossomos 4, 6 e 9 não apresentam marcadores BACs, sendo o quarto e sexto pares submetacêntricos e o nono metacêntrico em *P. watsoniana*. Em *P. alata*, esses cromossomos são todos metacêntricos e o cromossomo 4 é o terceiro maior em tamanho (Figura 3).

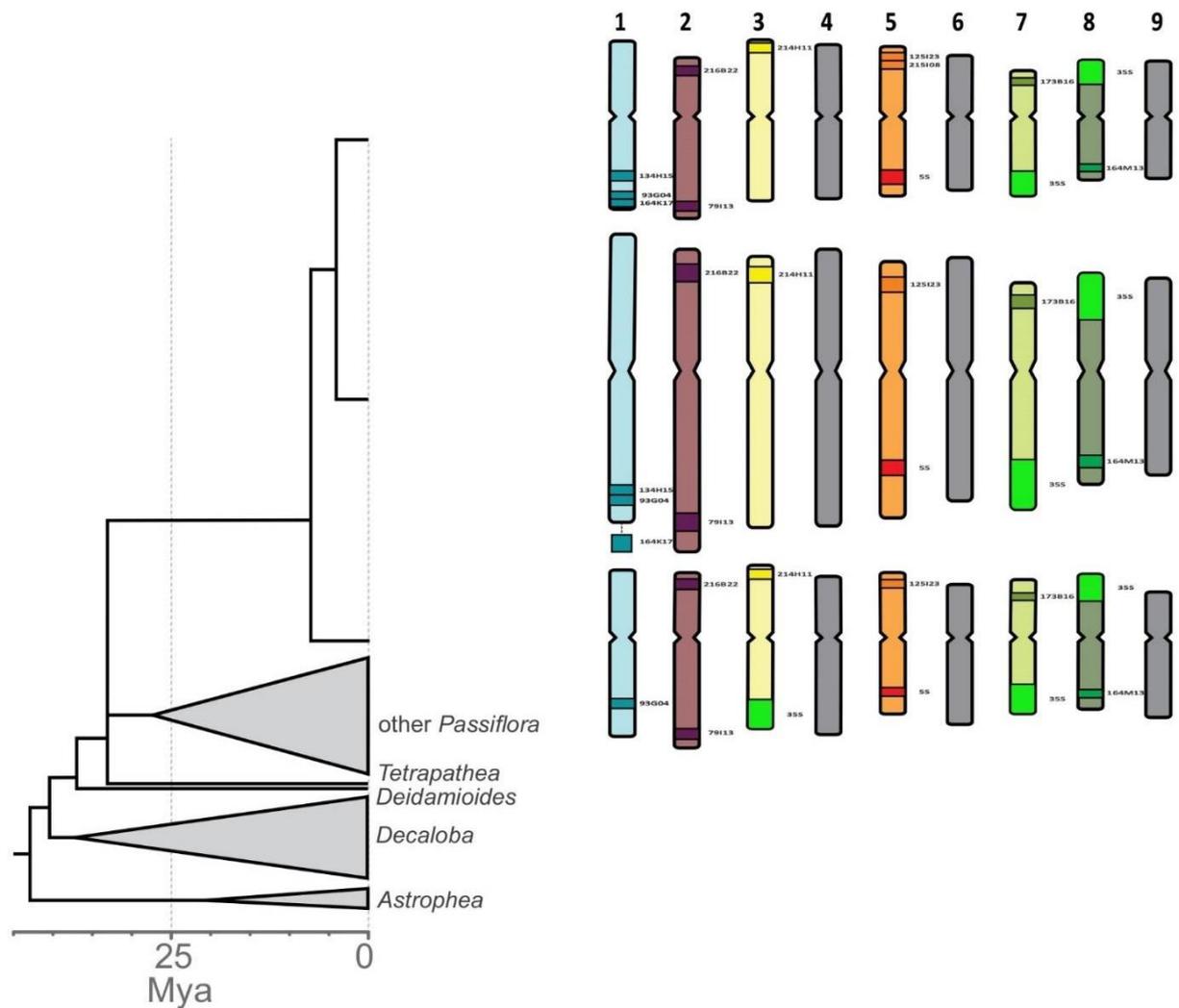


Figura 3 – Idiogramas comparativos de *P. alata* e *P. watsoniana* comparados ao de *P. edulis* (Sader 2016). O idiograma mostra o tamanho relativo dos braços, posição dos centrômeros e posição dos clones mapeados em ambas espécies. As relações filogenéticas entre as espécies está baseada em Sader et al, 2018.

Elementos repetitivos

Foram utilizadas três sequências repetitivas (*Ty1*-Copia, *Ty3*-Gypsy e LINE) em busca de padrões de distribuição que pudessem auxiliar na identificação dos cromossomos do complemento. Em *P. alata*, o elemento *Ty1*-Copia revelou uma marcação dispersa, porém mais concentrada na região pericentromérica na maioria dos cromossomos. Em *P. watsoniana*, a marcação foi mais diferenciada, marcando em geral a região proximal, porém com uma clara marcação pericentromérica ou mais concentrada em um dos braços em alguns pares (4a, c). O elemento *Ty3*-Gypsy apresentou uma distribuição dispersa e uniforme em todo o genoma de ambas as espécies analisadas,

inclusive nos sítios de DNAr 35S. (Figura 4b, d). O elemento LINE, testado em *P. alata*, não apresentou nenhuma marcação, embora essa sonda tenha revelado uma distribuição dispersa para esse elemento em todos os cromossomos de *P. edulis* (Sader, 2016).

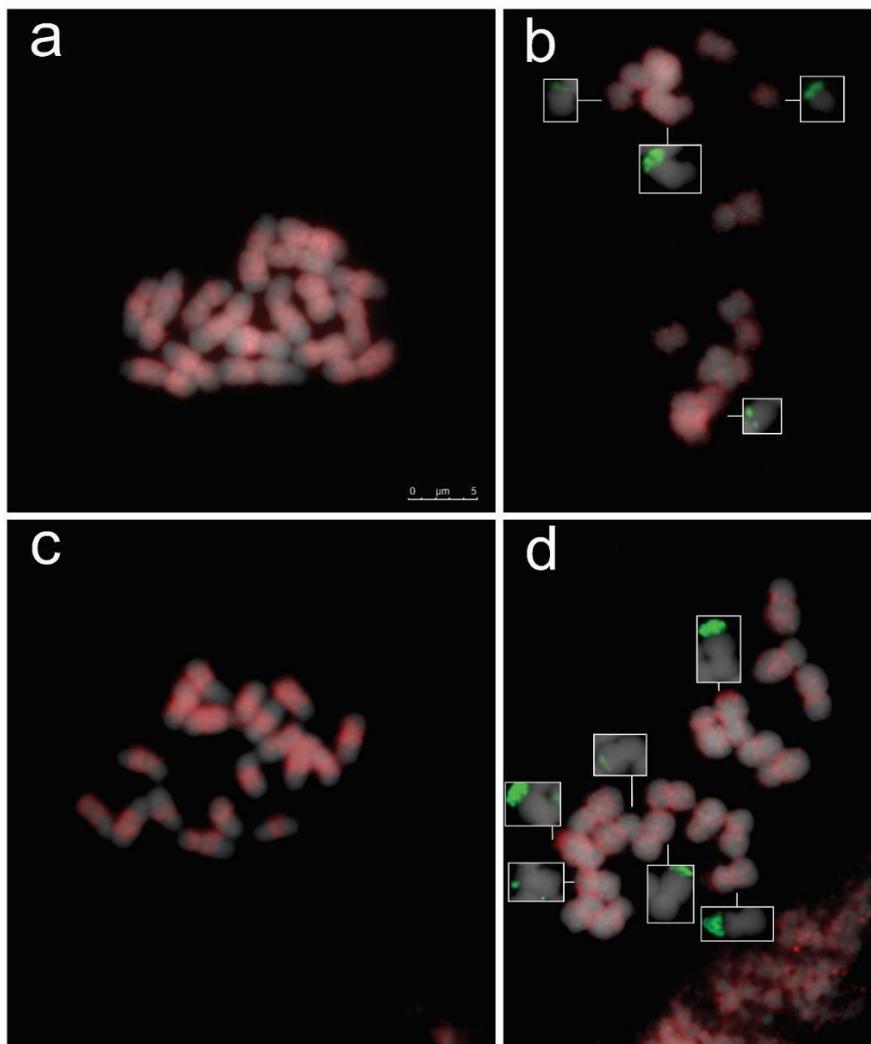


Figura 4 – Distribuição dos elementos repetitivos Ty1-copia (a, c, vermelho) e Ty3-gypsy (b, d, vermelho), e DNAr 35S (b, d, verde), em *P. alata* (a, b) e *P. watsoniana* (c, d).

Discussão

A FISH com BACs cópia única de *P. edulis* em *P. alata* e *P. watsoniana* permitiu a identificação de seis pares cromossômicos com marcadores cromossomo-específicos, possibilitando o estabelecimento de homeologias entre as espécies (Sader, 2016). Nenhuma quebra de sintenia ou colinearidade foi detectada entre as espécies no presente trabalho. A construção de mapas citogenéticos comparativos baseado em BAC-FISH tem se mostrado uma importante ferramenta no estudo evolutivo entre

espécies relacionadas, identificando desde grandes modificações estruturais ou numéricas, ou rearranjos em que o número cromossômico é mantido (Fonseca *et al*, 2012; Betekhtin; Jenkins; Hasterok, 2014).

Uma vez que o número de marcadores utilizados foi limitado, não é possível excluir a possibilidade de rearranjos não detectados. Além dos BACs marcadores estabelecidos para *P. edulis* (Sader, 2016) foram testados nove BACs adicionais, e todos apresentaram sinal repetitivo uniforme. A técnica de BAC-FISH é uma ferramenta geralmente usada em espécies de genomas pequenos, cujo DNA repetitivo é menos disperso e abundante que em espécies de genoma maior. Tem tido grande sucesso em genomas como arroz (Cheng *et al*, 2001), feijão comum (Fonsêca *et al*, 2010), assim como em espécies de *Solanum* (Szinay *et al*, 2012), *Brachypodium* (Betekhtin; Jenkins; Hasterok, 2014), entre outras. Nas espécies aqui estudadas, com um tamanho de genoma intermediário, poucos BACs, apenas com localização subterminal ou terminal, puderam ser mapeados como sequências únicas, mesmo quando selecionados, após sequenciamento, aqueles mais ricos em genes. Isso limitou o número de marcadores, especialmente nas regiões proximal e intersticial dos cromossomos, assim como observado em cevada (Poursarebani *et al*. 2014).

Para todos os cromossomos analisados, os marcadores estão conservados nos mesmos braços (curto ou longo) em ambas espécies e em relação a *P. edulis* (Sader, 2016) apresentando distâncias similares em relação aos telômeros. As distâncias em relação aos centrômeros, no entanto, são maiores em *P. alata*, o que pode ser explicado pela diferença no tamanho do genoma dessa espécie (2.208 pg) em relação às demais (1,258 pg para *P. edulis* e 1,305 pg para *P. watsoniana*, (Yotoko *et al*. 2011) característica refletida no maior acúmulo de elementos nas regiões proximais dos cromossomos, como observado com o elemento *TyI*-copia.

Embora sinais únicos sejam mais eficientes na identificação cromossômica, elementos repetitivos têm também sido usados nesta identificação (Ferreira; Martins, 2008). Neste trabalho foram utilizados três elementos repetitivos gerados a partir de *P. edulis*, dos quais apenas dois mostraram sinais nas espécies analisadas. O elemento LINE não apresentou marcação em *P. alata*, tendo apresentado um padrão disperso em *P. edulis* (Sader, 2016). Isso pode ser explicado pelo fato desse elemento constituir uma porção menor no genoma em comparação a outros tipos de elementos repetitivos em *Passiflora* (Santos *et al*, 2014) ou por uma menor conservação de sequência.

O elemento *TyI*-Copia apresentou distribuição mais concentrada na região

proximal, compatível com a localização subterminal ou terminal dos BACs únicos nas três espécies, em regiões mais ricas em genes. Os retrotransposons são caracterizados por sua localização dispersa pelo cromossomo, com grande concentração em áreas de baixa recombinação (Wright *et al*, 2003). Entretanto, em um trabalho feito com *Erianthus arundinaceus*, onde quatro linhagens de *Ty1*-Copia foram analisadas, a distribuição desse retrotransposon mostrou ser distal para quase todos os cromossomos. As quatro linhagens tiveram distribuição muito similar (Huang *et al*, 2017). O mesmo foi observado em *Jatropha curcas*, cujas linhagens de *Ty1*-Copia foram distais, mas com presença de sequências flanqueadoras de genes (Alipour *et al*, 2013). O elemento *Ty3*-Gypsy tem distribuição dispersa nos cromossomos de *P. alata* e *P. watsoniana*, embora seja comum esse elemento estar localizado nas regiões centroméricas ou pericentroméricas (Santos *et al*, 2015; Nunes *et al*, 2018; Zhang *et al*, 2017).

Para o cromossomo 1 foi observado que os 3 marcadores do braço longo estão na mesma posição em *P. alata* e *P. edulis*, embora um dos BACs (164K17) esteja em uma região terminal distendida, mais evidente em *P. alata*, mas também observada e previamente reportada como uma constrição secundária em *P. edulis* em trabalho com coloração convencional (Miranda *et al*, 2008). Essa constrição não corresponde a DNAr em nenhuma das espécies e não está clara qual a sua natureza. De toda forma, a condensação não uniforme ao longo dos cromossomos, aliada à diferença na abundância de DNA repetitivo entre espécies, principalmente na região proximal, pode explicar as pequenas diferenças observadas no tamanho e razão de braços entre os cromossomos 1 e 2 e 3 e 4. Isso também pode explicar as divergências em relação a cariótipos anteriores (Meletti *et al*, 2003; Silvia *et al*, 2005; Miranda *et al*, 2008), principalmente considerando a similaridade entre os cromossomos e a impossibilidade de reconhecimento dos pares sem marcas cromossomo-específicas.

Um sítio extra de DNAr foi detectado no cromossomo 3 de *P. watsoniana*, o que foi confirmado pela presença do BAC marcador 214H11 no braço oposto. Assim como o DNAr 5S, os demais sítios de DNAr 35S nos cromossomos 7 e 8 foram conservados em localização, sugerindo uma amplificação do DNAr 35S no cromossomo 3. Além de *P. watsoniana*, outras espécies do clado com $x = 9$ (*P. edmundoi*, *P. elegans* e *P. mucronata*) possuem três sítios de DNAr 35S. Para essas espécies, dois sítios foram descritos para os pares 1 e 3, e o terceiro sítio nos pares 7, 9 e 8, respectivamente (Melo *et al*, 2003), mas considerando as variações entre os cariótipos descritos, é possível que haja conservação na localização dos três sítios de DNAr nessas espécies, o que precisa

ser confirmado.

O gênero *Passiflora* apresenta extensa variabilidade cromossômica numérica, bem como na quantidade de sítios de DNA ribossomal e tamanho do genoma (Melo *et al*, 2001; Souza *et al*, 2003; Melo 2003; Yotoko *et al*, 2011). Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que, apesar dessas variações e das diferenças de tamanho entre homeólogos dessas espécies, a sintenia entre esses genomas parece conservada, sem a ocorrência de macrorearranjos. Em *Phaseolus*, grupo conhecido por sua estabilidade cariotípica e recente diversificação, os genomas também foram sintênicos quando não houve mudança cromossômica numérica (Fonsêca; Pedrosa-Harand, 2017), embora inversões, principalmente pericêntricas, tenham sido detectadas. Os dados do presente trabalho mostram que é pouco provável conseguir BACs para regiões proximais dos cromossomos de *Passiflora* devido ao tamanho dos seus genomas. Sendo assim, apenas o uso de sondas mais curtas (conjuntos de oligonucleotídeos) ou a comparação de genomas completos, ainda não disponíveis para o gênero, permitirá confirmar se a diferença entre os cromossomos homeólogos se deve apenas à abundância de sequências repetitivas na região proximal.

Agradecimentos

Os autores são gratos a Marcelo Guerra pela coleta de *P. watsoniana* e à CAPES (Y.D.), FACEPE (M.S.) e CNPq (A.P-H.) pelas bolsas concedidas.

Referências

- Alipour A, Tsuchimoto S, Sakai H, Ohmido N, Fukui K (2013) Structural characterization of copia-type retrotransposons leads to insights into the marker development in a biofuel crop, *Jatropha curcas* L. *Biotechnol Biofuels*. 2013;6(1):129. Published 2013 Sep 10. doi:10.1186/1754-6834-6-129
- Betekhtin A, Jenkins G, Hasterok R (2014) Reconstructing the Evolution of Brachypodium Genomes Using Comparative Chromosome Painting. *PLoS ONE* 9: e115108. doi: 10.1371/journal.pone.0115108
- Carvalho CR, Saraiva LS (1993) An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. *Biotech Histochem Off Publ Biol Stain Comm* 68:142–145
- Cheng Z (2001) Toward a Cytological Characterization of the Rice Genome. *Genome Res* 11:2133–2141. doi: 10.1101/gr.194601
- Ferreira IA, Martins C (2008) Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron* 39:411–418. doi: 10.1016/j.micron.2007.02.010
- Fonsêca A, Ferreira J, dos Santos TRB, et al (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Res* 18:487–502. doi: 10.1007/s10577-010-9129-8
- Fonsêca A, Pedrosa-Harand A (2017) Cytogenetics and Comparative Analysis of *Phaseolus* Species. In: Pérez de la Vega M, Santalla M, Marsolais F (eds) *The Common Bean Genome*. Springer International Publishing, Cham, pp 57–68
- Gerlach WL, Bedbrook JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res* 7:1869–1885
- Hansen AK, Gilbert LE, Simpson BB, et al (2006) Phylogenetic Relationships and Chromosome Number Evolution in *Passiflora*. *Syst Bot* 31:138–150. doi: 10.1600/036364406775971769
- Huang Y, Luo L, Hu X, Yu F, Yang Y, Deng Z, Wu J, Chen R, Zhang M. (2017). Characterization, Genomic Organization, Abundance, and Chromosomal Distribution of Ty1-copia Retrotransposons in *Eriarthus arundinaceus*. *Frontiers in plant science*, 8, 924. doi:10.3389/fpls.2017.0924
- Jiang J, Gill BS (2006) Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49:1057–1068. doi: 10.1139/g06-076
- Lysak MA (2005) Chromosome triplication found across the tribe Brassiceae. *Genome Res* 15:516–525. doi: 10.1101/gr.3531105

- Lysak MA, Pecinka A, Schubert I (2003) Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species. *Chromosome Res Int J Mol Supramol Evol Asp Chromosome Biol* 11:195–204
- Ma L, Vu GTH, Schubert V, et al (2010) Synteny between *Brachypodium distachyon* and *Hordeum vulgare* as revealed by FISH. *Chromosome Res* 18:841–850. doi: 10.1007/s10577-010-9166-3
- Meletti LMM, Bernacci LC, Soares-Scott MD, et al (2003) Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agronômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). *Rev Bras Frutic* 25:275–278. doi: 10.1590/S0100-29452003000200023
- Melo NF (2003) Variability of the 5S and 45S rDNA Sites in *Passiflora* L. Species with Distinct Base Chromosome Numbers. *Ann Bot* 92:309–316. doi: 10.1093/aob/mcg138
- Melo NF, Cervi AC, Guerra M (2001) Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Plant Syst Evol* 226:69–84. doi: 10.1007/s006060170074
- Miranda PM, Carvalho CR, Marcelino FC, Andréia Correa Mendonça M (2008) Morphological aspects of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* chromosomes using acridine orange banding and rDNA-FISH tools. *Caryologia* 61:154–159. doi: 10.1080/00087114.2008.10589623
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, et al (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161:1661–1672
- Peters SA, Bargsten JW, Szinay D, et al (2012) Structural homology in the Solanaceae: analysis of genomic regions in support of synteny studies in tomato, potato and pepper: Synteny in *Solanum* crops. *Plant J* 71:602–614. doi: 10.1111/j.1365-3113.2012.05012.x
- Poursarebani N, Ma L, Schmutzer T, et al (2014) FISH Mapping for Physical Map Improvement in the Large Genome of Barley: A Case Study on Chromosome 2H. *Cytogenet Genome Res* 143:275–279. doi: 10.1159/000366028
- Sader MA. (2016) Mapeamento citogenético do maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae). Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Programa de Pós- Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco – PE.
- Sader MA, Amorin BS, Costa L, Souza G, Pedrosa-Harand A. (2018) The role of chromosome changes in the diversification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Systematics and Biodiversity*.
- Santos A, Penha H, Bellec A, et al (2014) Begin at the beginning: A BAC-end view of the passion fruit (*Passiflora*) genome. *BMC Genomics* 15:816. doi:

10.1186/1471-2164-15-816

- Silvia MC, Vieira MLC, Mondin M, Aguiar-Perecin MLR (2005) Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. *Caryologia* 58:220–228. doi: 10.1080/00087114.2005.10589454
- Souza MM de, Pereira TNS, Silva L da C, et al (2003) Karyotype of Six *Passiflora* Species Collected in the State of Rio de Janeiro. *Cytologia (Tokyo)* 68:165–171. doi: 10.1508/cytologia.68.165
- Souza MM, Palomino G, Pereira TNS, et al (2004) Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species: Nuclear DNA content of *Passiflora* species. *Hereditas* 141:31–38. doi: 10.1111/j.1601-5223.2004.01739.x
- Szinay D, Wijnker E, van den Berg R, et al (2012) Chromosome evolution in *Solanum* traced by cross-species BAC-FISH. *New Phytol* 195:688–698. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04195.x
- Ulmer T, MacDougal JM (2004) *Passiflora: Passionflowers of the world*. Timber Press, Portland.
- Wanzenböck EM, Schöfer C, Schweizer D, Bachmair A (1997) Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 11:1007–1016. PMID: 9193072.
- Wright SI, Agrawal N, Bureau TE (2003) Effects of recombination rate and gene density on transposable element distributions in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res* 13:1897–1903. doi: 10.1101/gr.1281503
- Xiong Z, Kim JS, Pires JC (2010) Integration of Genetic, Physical, and Cytogenetic Maps for *Brassica rapa* Chromosome A7. *Cytogenet Genome Res* 129:190–198. doi: 10.1159/000314640
- Yotoko KSC, Dornelas MC, Togni PD, et al (2011) Does Variation in Genome Sizes Reflect Adaptive or Neutral Processes? New Clues from *Passiflora*. *PLoS ONE* 6:e18212. doi: 10.1371/journal.pone.0018212
- Zhang P, Li W, Fellers J, et al (2004) BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. *Chromosoma* 112:288–299. doi: 10.1007/s00412-004-0273-9
- Zhang Y, Fan C, Li S, Chen Y, Wang RR.-C., Zhang X, Han F, Hu Z (2017) The Diversity of Sequence and Chromosomal Distribution of New Transposable Element-Related Segments in the Rye Genome Revealed by FISH and Lineage Annotation. *Frontiers in Plant Science* 8:1706. doi: 10.3389/fpls.2017.01706

4 CONCLUSÕES

- A técnica de BAC-FISH é uma ferramenta efetiva em estudos citogenéticos comparativos e de evolução cariotípica para *Passiflora*, permitindo a identificação de seis pares cromossômicos em duas espécies;
- Não foi detectada quebra de sintenia ou colinearidade entre essas espécies, apesar de diferenças no tamanho cromossômico e, em alguns casos, na razão de braços;
- Os elementos Ty3-gypsy e Ty1-copia usados mostraram uma localização uniforme ou preferencialmente proximal, respectivamente, em ambas as espécies. Em contrapartida, os BACs foram localizados nas regiões terminais ou subterminais, sugerindo que estas regiões são ricas em genes;
- O uso desses marcadores em outras espécies do gênero com número cromossômico diferente pode ampliar o entendimento sobre a evolução cariotípica do grupo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E M. *et al.* A New Species of *Ameroglossum* (Scrophulariaceae) Growing on Inselbergs in Northeastern Brazil. **Systematic Botany**. [s.l.], v. 41, n. 2, p. 423–429, 2016.
- ARAÚJO, D.; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Passifloraceae s.s. **Rodriguésia**. [s.l.], v. 64, n. 2, p. 247–254, 2013.
- ARIYADASA, R.; STEIN, N. Advances in BAC-Based Physical Mapping and Map Integration Strategies in Plants. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. [s.l.], v. 2012, p. 1–11, 2012.
- BEGUM, R. Comparative molecular cytogenetic analyses of a major tandemly repeated DNA family and retrotransposon sequences in cultivated jute *Corchorus* species (Malvaceae). **Annals of Botany**. [s.l.], v. 112, n. 1, p. 123-134, 2013.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. **Plant DNA C-values database (release 6.0)**. 2012. Disponível em: <<http://data.kew.org/cvalues/>>. Acesso em: 25 ago, 2018.
- BETEKHTIN, A.; JENKINS, G.; HASTEROK, R. Reconstructing the Evolution of *Brachypodium* Genomes Using Comparative Chromosome Painting. **PLoS ONE**. [s.l.], v. 9, n. 12, p. 115-118, 2014.
- CABRAL, J. S.; FELIX, L. P.; GUERRA, M. Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). **Genetics and Molecular Biology**. [s.l.], v. 29, n. 4, p. 659– 664, 2006.
- CHENG, Z. Toward a Cytological Characterization of the Rice Genome. **Genome Research**. [s.l.], v. 11, n. 12, p. 2133–2141, 2001.
- CORBET, S. A., W., P. G. *Passiflora* and *Xylocopa*: economic and evolutionary considerations. **Acta Bot. Neerl.** [s.l.], v. 29, n. 1, p. 55, 1980.
- CORDEIRO, J. M. P. *et al.* Karyotype analysis in *Bignoniaceae* (Bignoniaceae): chromosome numbers and heterochromatin. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. [s.l.], v. 89, n. 4, p. 2697–2706, 2017.
- ESCOBAR, L. K. A New Subgenus and Five New Species in *Passiflora* (Passifloraceae) from South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. Columbia, v. 76, n. 3, p. 877, 1989.
- FERREIRA, T. G. T. Outcrossing rate in sweet passion fruit based on molecular markers. **Plant Breeding**. [s.l.], v. 129, n. 1, p. 727–730, 2010.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora**. [s.l.], v. 13, n. 1, p. 34–38, 2003.

FONSÊCA, A. *et al.* Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Chromosome Research**. [s.l.], v. 18, n. 4, p. 487–502, 2010.

GARDINER, J. Anchoring 9,371 Maize Expressed Sequence Tagged Unigenes to the Bacterial Artificial Chromosome Contig Map by Two-Dimensional Overgo Hybridization. **PLANT PHYSIOLOGY**. [s.l.], v. 134, n. 4, p. 1317–1326, 2004.

GBIF. **Taxonomia Backbone do Gbif: lista de dados da lista de verificação**. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.15468/39omei>>. Acesso em: 18 set. 2018.

GREILHUBER, J. Why Plant Chromosomes Do Not Show G-Bands. TAG. Theoretical and applied genetics. **Theoretische und angewandte Genetik**. [s.l.], v. 50, p. 121–124, 1977.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**. [s.l.], v. 23, n. 4, p. 1029–1041, 2000.

_____. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

HAMMETT, K. R. W. *et al.* Secondary constrictions and NORs of of Lathyrus investigated by silver staining and in-situ hybridization. **Heredity**. [s.l.], v. 68, n. 5, p. 473–478, 1992.

HANSEN, A. K. *et al.* Phylogenetic Relationships and Chromosome Number Evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany**. [s.l.], v. 31, n. 1, p. 138–150, 2006.

HESLOP-HARRISON, J. S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The Plant Cell**. [s.l.], v. 12, n. 5, p. 617–636, 2000.

JENKINS, G.; HASTEROK, R. Reconstructing the Evolution of *Brachypodium* Genomes Using Comparative Chromosome Painting. **Plos One**. [s.l.], v. 9, n. 12, p. 115-118, 2000.

JIANG, J.; GILL, B. S. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. **Genome**. [s.l.], v. 49, n. 9, p. 1057–1068, 2006.

JUDD, W. S. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 1999.

KARAFIÁTOVÁ, M. *et al.* Mapping nonrecombining regions in barley using multicolor FISH. **Chromosome Res**. [s.l.], v. 21, n. 8, p. 739-751, 2013.

KATO, A. *et al.* Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. **Current Opinion in Plant Biology**. [s.l.], v. 8, n. 1, p. 148–154. 2005.

- KILLIP, E. P. **The American species of Passifloraceae**. Chicago: University Press, 1938.
- KOSCHNITZKE, C.; SAZIMA, M. Biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. **Revista Brasileira de Botânica**. São Paulo, v. 20, n. 2, p. 119–126, 1997.
- KUMAR, A.; BENNETZEN, J. L. Plant Retrotransposons. **Annual Review of Genetics**. [s.l.], v. 33, n. 1, p. 479–532, 1999.
- LEE, S. I.; KIM, N. S. Transposable Elements and Genome Size Variations in Plants. **Genomics & Informatics**. [s.l.], v. 12, n. 87, 2014.
- LYSAK, M. A. Chromosome triplication found across the tribe Brassiceae. **Genome Research**. [s.l.], v. 15, n. 4, p. 516–525, 2005.
- MACDOUGAL, J. M. Revision of *Passiflora* Subgenus Decaloba Section Pseudodysosmia (Passifloraceae). **Systematic Botany Monographs**. [s.l.], v. 41, n. 1, p. 1, 1994.
- MAYEDA, L.Y. **Estudo citogenético em dez táxons do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. 1997. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 1997.
- MELETTI, L. M. M. *et al.* Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agrônômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira de Fruticultura**. [s.l.], v. 25, n. 2, p. 275–278, 2003.
- MELO, N. F. Variability of the 5S and 45S rDNA Sites in *Passiflora* L. Species with Distinct Base Chromosome Numbers. **Annals of Botany**. [s.l.], v. 92, n. 2, p. 309–316, 2003.
- MERCADO, P. R.; DELGADO, A. S. Karyotypic Studies on Species of *Phaseolus* (Fabaceae: Phaseolinae). **American Journal of Botany**. [s.l.], v. 85, n. 1, p. 1, 1998.
- MILWARD, M. A. A. *et al.* Palinotaxonomia de *Passiflora* L. subg. *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. [s.l.], v. 24, n. 1, p. 133–145, 2010.
- MIRANDA, P. M. *et al.* Morphological aspects of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* chromosomes using acridine orange banding and rDNA-FISH tools. **Caryologia**. [s.l.], v. 61, n. 2, p. 154–159, 2008.
- MUSCHNER, V. C. *et al.* Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology**. [s.l.], v. 35, n. 4, p. 1036–1043, 2012.
- OLIVEIRA, J. A. R. S. A. **Maracujá: produção e mercado**. [s.l.]: UESB-DFZ, 1994.

PEREIRA, G. S. *et al.* Molecular polymorphism and linkage analysis in sweet passion fruit, an outcrossing species: Molecular map in sweet passion fruit. **Annals of Applied Biology**, v. 162, n. 3, p. 347–361, maio 2013.

PEDROSA-HARAND, A.; GUERRA, M. Contribuições da FISH para a citogenética de plantas. In: FISH (fluorescent *in situ* hybridization) – Conceitos e aplicações na citogenética. **Sociedade Brasileira de Genética**. [s.l.], 2004. 176p.

RAMA RAO, S. *et al.* DNA repetitive sequences-types, distribution and function: A review. **Journal of Cell and Molecular Biology**. [s.l.], v. 7, n. 8, p. 1–11, 2010.

SADER, M. A. **Mapeamento citogenético do maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae)**. 2016. 53 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 2016.

SADER, M. A. *et al.* The role of chromosome changes in the diversification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Systematics and Biodiversity**, 2018.

SANTOS, A. *et al.* Begin at the beginning: A BAC-end view of the passion fruit (*Passiflora*) genome. **BMC Genomics**. [s.l.], v. 15, n. 1, p. 816, 2014.

SCHNABLE, A. *et al.* The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. **Science**. [s.l.], v. 326, n. 5956, p. 1112–1115, 2009.

SILVIA, M. C. *et al.* Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**. [s.l.], v. 58, n. 3, p. 220–228, 2005.

SOUZA, M. M. *et al.* Karyotype of Six *Passiflora* Species Collected in the State of Rio de Janeiro. **CYTOLOGIA**. [s.l.], v. 68, n. 2, p. 165–171, 2003.

SILVA, S. C. *et al.* The Cytogenetic Map of the *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.—A Nomenclature System for Chromosomes of All Citric Species. **Tropical Plant Biology**. [s.l.], v. 4, n. 2, p. 99–105, 2011.

SOUZA, M. M. *et al.* Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species: Nuclear DNA content of *Passiflora* species. **Hereditas**. [s.l.], v. 141, n. 1, p. 31–38, 2004.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIEIRA, M. L. C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing Brazilian species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. [s.l.], v. 51, n. 2, p. 247–258, 2008.

SZINAY, D. *et al.* Chromosome evolution in *Solanum* traced by cross-species BAC-FISH. **New Phytologist**. [s.l.], v. 195, n. 3, p. 688–698, 2012.

TANG, H. *et al.* Synteny and Collinearity in Plant Genomes. **Science**, [s.l.], v. 320, n. 5875, p. 486–488, 2008.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. *Passiflora: Passionflowers of the world*. Portland: Timber Press, 2004.

VANDERPLANK, J. *Passion flowers*. 2. ed. Cambridge, Mass: MIT Press, 1996.
VIANA, A. J. C.; SOUZA, M. M. Comparative cytogenetics between the species *Passiflora edulis* and *Passiflora cacaoensis*. **Plant Biology**. Stuttgart, Ger, v. 14, n. 5, p. 820–827, 2012.

XIONG, Z.; KIM, J. S.; PIRES, J. C. Integration of Genetic, Physical, and Cytogenetic Maps for *Brassica rapa* Chromosome A7. **Cytogenetic and Genome Research**. [s.l.], v. 129, n. 1–3, p. 190–198, 2010.

YOTOKO, K. S. C. *et al.* Does Variation in Genome Sizes Reflect Adaptive or Neutral Processes? New Clues from *Passiflora*. **PLoS ONE**. [s.l.], v. 6, n. 3, p. 182-192, 2011.

ZHANG, P. *et al.* BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. **Chromosoma**. [s.l.], v. 112, n. 6, p. 288–299, 2004